UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

4 MAR 1947

208

O. VERONA

Sulla determinazione della carica microbica nel latte

Estratto dalla - RIVISTA ITALIANA D' IGIENE -
Anno VI (1946) N. 1-6

Estratto dalla « *Rivista Italiana d'Igiene* »
Anno VI (1946) N. 1-6

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell' Università di Pisa
Direttore: Prof. **R. Perotti**

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Firenze
Direttore inc.: Prof. **O. Verona**

Sulla determinazione della carica microbica nel latte

Prof. O VERONA

È noto come all'analisi microbiologica del latte si richieda, tra l'altro, la determinazione della carica microbica, ovvero sia del numero dei microbi presenti in un determinato volume di latte: di norma in 1 cc.. È anche noto come alla ricerca si attribuisca importanza zimotecnica e, più ancora, igienica in quanto un elevato o meno contenuto microbico dà indice delle modalità con le quali il latte è stato munto e raccolto e, quindi, di eventuali inquinamenti ambientali, come dà indice dello stato di conservazione del prodotto.

Ebbene, allo scopo, sono stati escogitati numerosi procedimenti intesi a fornire reperti relativamente esatti e, nel contempo, di facile e rapida ricognizione. Il complesso dei procedimenti proposti al riguardo si fonda, essenzialmente, sull'esame colturale e sul conteggio diretto.

Lasciando da parte questi ultimi metodi — tra i quali viene dato, come migliore, quello di BREED, pertanto incluso tra i metodi standard americani (1) — i classici metodi colturali si basano sul conteggio delle colonie microbiche sviluppatesi su adatto substrato alimentare trascorso, ad una determinata temperatura, un certo tempo di incubazione.

La metodica americana, dopo aver dato ben precise norme circa il modo di prelevare, trasportare, conservare e preparare i campioni da sottoporsi ad analisi, fissa alcune prescrizioni fondamentali da seguirsi nei riguardi dell'allestimento delle diluizioni

(1) *Standard method of milk analysis*. Amer. publ. Health. Ass., New York, 1934.

e delle scatole PETRI, della preparazione del terreno nutritivo, della temperatura e durata di incubazione e, finalmente, della conta e interpretazione dei risultati.

Per quanto si riferisce al mezzo nutritivo viene prescritto l'agar seguente :

estratto di carne	0,3
peptone	0,5
agar	1,5
acqua distillata	100,0

L'agar deve essere della migliore qualità e, prima dell'uso, deve essere lavato con acqua distillata per allontanare eventuali impurità. Il mezzo, che si sterilizza per 20' a 120°, deve presentare una reazione pari al pH 6.4 — 7.

Per quanto riguarda la preparazione delle diluizioni si ricorda come il campione del latte debba essere al momento delle semine agitato capovolgendolo 25 volte di seguito ; quindi si preleva da esso 1 cc. di liquido e si versa in 99 cc. di acqua sterile contenuta in appositi recipienti. Ottenuta in tal modo una diluizione pari ad 1 : 100 ed omogeneizzato il liquido si ripete l'operazione versando 1 cc. di questa diluizione in altri 99 cc. di acqua sterile onde ottenersi la diluizione di 1 : 10.000. Si procede ancora, qualora si renda necessario e, cioè, allorquando si presuma che il latte sia molto ricco di microrganismi, in modo da avere diluizioni più forti. Particolari norme si riferiscono al tipo dei recipienti in cui fare le diluizioni, al tipo di pipette da impiegarsi, ecc..

L'allestimento delle piastre viene eseguito, come di norma, usandosi piastre di cm. 10 di diametro. Le prove vengono effettuate insemenzando in doppio piastre con cc. 1 e 0.1 della diluizione 1 : 100 e 1 : 10.000. Si ottengono quindi quattro serie di piastre contenenti ciascuna 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 di cc. di latte.

Finalmente, per quanto si riferisce alla temperatura e al periodo di incubazione, il metodo prescrive 37°C. per 24 ore.

* * *

Nei procedimenti di conta dei microrganismi, allorquando si impieghi il metodo colturale ove si tratti, come avviene nella ge-

neralità dei casi, di promuovere lo sviluppo di specie aventi esigenze nutritive tra loro diverse, come nel terreno, ad es.; oppure esigenze trofiche particolari, come appunto nel latte, grande importanza assumono la natura e composizione del mezzo.

Pertanto, avendo avuto occasione di determinare il tasso microbico in alcuni campioni di latte mi sono chiesto se qualche altro substrato non si fosse presentato più adatto di quello indicato nel metodo standard americano.

Per la verità, proposte di questo genere, non sono mancate e, tra le diverse, richiama l'attenzione quella di DEMETER (1) che suggerisce di sostituire l'agar-brodo con un agar lattosato avente la seguente composizione:

estratto di carne	3
peptone Witte	5
lattosio	10
cloruro di sodio	5
agar	15
acqua distillata	1000
(pH = 6.2 — 7)	

DEMETER rileva che tale mezzo consente di evitare lo sviluppo di piccolissime colonie puntiformi (« pint point ») malamente reperibili ad occhio nudo, dovute a scarso sviluppo dei lattici nell'agar-brodo e, pertanto, di avere un maggior numero di colonie; inoltre si viene ad avere un numero più uniforme di colonie.

Tale mezzo è stato trovato superiore all'agar-brodo anche da RENCO (2) e, più recentemente, anche dallo scrivente.

In precedenza altri substrati consigliati erano, come è noto, l'agar-siero, l'agar--siero-peptone e simili incluso il latte digerito con pancreatina (ARNAUDI) e gli agar alla caseina comunque preparati (es. agar FRAZIER e RUPP); o altrimenti la gelatina e l'agar-carne semplici o lattosati o glucosati al 2-3 %.

---

(1) DEMETER. *Bakteriologische Untersuchungsmethoden*, Vienna, 1934.
(2) RENCO. *Annali dell'Istituto Sp. di Caseificio di Lodi*, 1935.

Tenuto presente che il mezzo alimentare deve consentire lo sviluppo del maggior numero di specie, fatto particolare riferimento ai fermenti lattici, e che questi richiedono come fattori di accrescimento quanto si racchiude nel complesso vitaminico B, ho pensato se non fosse stato possibile di migliorare il terreno di DEMETER aggiungendo ad esso dell'autolisato di lievito che, come è noto, è ricco di fattori vitaminici.

L'uso della aggiunta di lievito a mezzi colturali non è, peraltro, nuovo. Si ricorda infatti, il latte con lievito proposto da RUBINSKY (1) e il siero di latte con estratto di lievito proposto da STEVENSON (2).

Pertanto, all'agar di DEMETER, ho aggiunto prima di agarizzarlo,cc. 25 per litro di autolisato di lievito a parte preparato nel modo seguente :

gr. 100 di lievito compresso vengono aggiunti a cc. 200 di acqua e tenuti per 6 ore a b. m. alla temperatura di 55°C.. Previo raffreddamento il liquido viene decantato, quindi filtrato per aspirazione. Successivamente si concentra fino a metà volume a pressione ridotta e, per non prepararlo volta volta, si conserva sterilizzandolo a vapore fluente (100°C.) per tre volte consecutive in tre successivi giorni, un'ora al giorno.

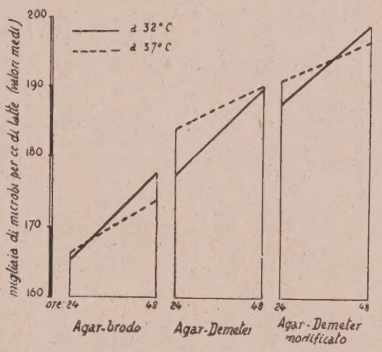
* * *

Ho eseguito pertanto prove comparative, su medesimi campioni di latte, usando l'agar-brodo, l'agar lattosato di DEMETER e lo stesso addizionato nella quantità precedentemente indicata di autolisato di lievito. Ho coltivato a 32°C. e a 37°C. eseguendo le letture dopo 24 e 48 ore in quattro serie di piastre insemenzate con 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10.000, 1 : 100.000 di cc. di latte. Le diluizioni furono effettuate in acqua previamente sterilizzata in autoclave in matracci da 250 cc. e gli insemenzamenti furono eseguiti con pipette graduate a 1/10 capaci di cc. 1.

(1) RUBINSKY. *Centr. f. Bakt.*,II, Abt., vol. 28, 1910.
(2) STEVENSON. *Centr. f. Bakt.*, II Abt., vol. 30, 1911.

La temperatura e il tempo di incubazione hanno notevole influenza sullo sviluppo microbico. Già è stato detto che il metodo standard americano prescrive una temperatura di 37°C. per la durata di 24 ore ; ma BREED (1) osserva che migliori risultati si ottengono a 32°C. per 48 ore.

Nella tabella allegata sono riportati i risultati conseguiti su campioni di latte integrale munto a mano e, salvo un campione, prelevato in stalle di conoscenza.



Influenza dei vari substrati, della temperatura di sviluppo e del tempo di incubazione nella determinazione della carica microbica nel latte.

Tali risultati confermano che il mezzo di DEMETER si presenta superiore all'agar-brodo e che è preferibile protrarre il tempo di incubazione per 48h a 32°C. piuttosto che procedere alla lettura dopo 24h a 37°C..

I reperti indicano, inoltre, che, addizionando il mezzo di DEMETER con autolisato di lievito, lo sviluppo microbico se ne avvantaggia, in quanto risulta un maggior numero di colonie ; non si osservano altresì (o sono in numero insignificante) le colonie puntiformi. Anche usando tale mezzo gli stessi reperti, infine, indicano che è preferibile coltivare a 32°C. anzichè a 37°C. protraendo però il periodo di incubazione fino alla 48.ma ora.

---

(1) BREED. *Relazione all'XI Congr. Mondiale d. latteria*, Berlino 1937.

Numero del campione	diluizioni	NUMERO DI MICRORGANISMI IN cc. 1 DI LATTE (i dati si riferiscono alla media di due piastre)											
		AGAR-BRODO (standard americano)				AGAR DEMETER				AGAR DEMETER MODIFICATO			
		a 32° C.		a 37° C.		a 32° C.		a 37° C.		a 32° C.		a 37° C.	
		dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 24 ore	dopo 48 ore
1 latte analizzato appena munto e colato dal mungitore attraverso setaccio metallico.	1:100	120.000	130.000	125.000	130.000	136.000	148.000	141.000	143.000	148.000	155.000	146.000	150.000
	1:1.000	128.000	145.000	140.000	140.000	140.000	155.000	156.000	162 000	151.000	160.000	155.000	162.000
	1:10.000	100.000	130.000	130.000	135.000	125.000	132.000	128.090	135.000	136.000	143.000	140.000	156 000
	1:100.000	115.000	125.000	128.000	130.000	120.000	143.000	132.000	141.000	138.000	150.000	141.000	148.000
	media	*115.750*	*132.500*	*130.750*	*133.750*	*130.250*	*144.250*	*139.250*	*145.250*	*143.250*	*152.000*	*145.555*	*154.000*
2 lo stesso dopo 12 ore a temperatura ambiente.	1:100	330.000	365.000	305.000	310.000	360.000	375.000	365.000	370.000	382.000	401.000	385.000	386.000
	1:1.000	355.000	370.000	310.000	320.000	380.000	390.000	380.000	385.000	395.000	416.000	392.000	402.000
	1:10.000	305.000	340.000	300.000	340.000	340.000	370.000	355.000	367.000	361.000	380.000	374.000	378.000
	1:100.000	290.000	310.000	270.000	295.000	335.000	350.000	342.000	351.000	342.000	365.000	350.000	363.000
	media	*320.000*	*346.250*	*296 250*	*316.225*	*353.750*	*371.250*	*360.500*	*368.250*	*370.000*	*390.500*	*375.250*	*382.250*
3 latte raccolto in recipiente sterile a mungitura iaiziate e analizzato dopo 3 ore dalla mungitura.	1:100	3.040	3.110	3.105	3.110	3.210	3.268	3.221	3.236	3.274	3 302	3.304	3.318
	1:1.000	2.900	2.980	2.960	2.972	3.000	3.105	3.090	3.112	3.112	3.181	3.200	3.236
	1:10.000	3.000	3.064	3.005	3.015	3.102	3.115	3.128	3.141	3.220	3.294	3.226	3.241
	1:100.000	2.810	2.916	2.900	2.921	3.020	3.042	3.080	3.112	3.172	3.280	3.215	3.250
	media	*2.937*	*3.017*	*2.992*	*3.004*	*3.083*	*3.142*	*3.129*	*3.150*	*3.194*	*3.264*	*3.236*	*3.261*
4 latte del commercio (Pisa).	1:100	380.000	392.000	405.000	407.000	396.000	422.000	412.000	420.000	416.000	424.000	420.000	422.000
	1:1.000	362.000	380.000	371.000	384 000	370.000	401.000	396.000	410.000	392.000	417.000	400.000	408.000
	1:10.000	375.000	390.000	380.000	386.000	382.000	400.000	405.000	412.000	405.000	420.000	413.000	417.000
	1:100.000	334.000	356.000	347.000	365.000	351.000	376.000	360.900	370.000	374.000	400.000	375.000	394.000
	media	*362.750*	*379.550*	*375.750*	*385.500*	*374.750*	*399.750*	*393 250*	*403.000*	*396.750*	*415.250*	*402.000*	*410.250*
5 latte prelevato in stalla poco dopo la mungitura.	1:100	27.000	31.000	26.500	27.100	29.050	34.150	32.100	33.900	32.200	32.600	31 700	31.800
	1:1 000	22.000	25.500	25.000	25.800	25.600	27.000	26.700	28.250	28.100	30.100	29.500	30.200
	1:10.000	25.000	28.300	27.200	27.400	28.250	32.300	28.300	30.000	31.400	32.000	30.200	30.700
	1:100.000	19.500	24.200	21.700	23.200	22.300	26.800	24.500	26.000	27.500	28.700	29.000	30.100
	media	*24.725*	*27.250*	*25.100*	*25.875*	*26.300*	*30.062*	*27.900*	*29.537*	*29.800*	*30.850*	*30.100*	*30.700*
Media dei 5 campioni		165.232	177.703	166.168	172.871	177.625	189.691	184.806	189.837	188.599	198.373	191.228	196.092

RIASSUNTO

L'A., nella presente Nota, dimostra come, per il conteggio dei microrganismi nel latte col metodo colturale, il medesimo si avvantaggi dall'impiego del mezzo di DEMETER opportunamente modificato mediante aggiunta di autolisato di lievito.

La conta dovrebbe essere effettuata dopo 48h di incubazione a 32°C., anzichè dopo 24h a 37°C. come prescrive il metodo standard americano.